

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

19.06.03

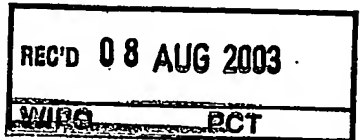
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月20日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-180543
[ST. 10/C]: [JP2002-180543]

出 願 人
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

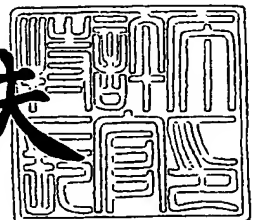


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003154

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 武田 正敬

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 阿部 邦威

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 山地 昇

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089200

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109357

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005348

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 7 で表される塩基配列、あるいは、配列番号 1 7 記載の塩基配列の中のいずれかの 1 ～ 1 0 個の部位において、1 ～ 1 0 個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、配列番号 2 記載のポリペプチドのプロモーター活性を有するポリヌクレオチド。

【請求項 2】 配列番号 1 7 で表される塩基配列を含む、請求項 1 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】 請求項 1 乃至請求項 2 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 4】 請求項 3 記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

【請求項 5】 (1) 請求項 4 記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び (2) プロモーター活性を検出する工程を含む、試験化合物が請求項 1 乃至請求項 2 記載のポリヌクレオチドのプロモーター活性を阻害するか否かを分析する方法。

【請求項 6】 請求項 5 記載の方法による分析工程、及びプロモーター活性を阻害する物質を選択する工程を含む、配列番号 2 記載のポリペプチドの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 7】 請求項 6 記載の方法により、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法。

【請求項 8】 請求項 5 記載の方法による分析工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なプロモーターに関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、ディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ドメイン、及びトロンボスポンジン I 型繰り返し配列（以下、TSP-1 繰り返し配列と称する）を含む分子群である。

前記ヒト ADAMTS 分子の中で、ADAMTS4（アグリカナーゼ 1）及び ADAMTS11（アグリカナーゼ 2）では、細胞外基質アグリカン（第 373 番目のグルタミン酸残基と第 374 番目のアラニン残基との間（Glu³⁷³-Ala³⁷⁴の間）で選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されていた（Tortorella M.D. ら, Science, 284, 1664-1666, 1999；及び Abbaszade I. ら, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999）。また、ADAMTS2（プロコラーゲン I N-プロテイナーゼ）は、I 型コラーゲンプロ体の N 末部の切断除去酵素として、I 型コラーゲンのプロ体から成熟型への転換に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしており、その遺伝子の異常と VIIC 型エーラーズ・ダンロス (Ehlers-Danlos) 症候群との関連性が示されている（Colige A. ら, Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999）。

すなわち、ADAMTS 分子は、アグリカンやコラーゲン等の細胞外マトリクスの分解及び成熟といった代謝に関与することが示されている。

【0003】

一方、慢性腎不全は、糸球体硬化及び腎間質線維化を特徴とする疾患であり、細胞外マトリクス成分の質的変化及び／又は量的増加が主要な発病及び進行機序とされている。腎不全疾患モデルを用いた実験において、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) の特異的な作用抑制タンパク質であるデコリンの遺伝子導入（Isaka Y. ら, Nature Med., 2, 418-423, 1996）や抗 TGF- β 投与（Ziyadeh F.N. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 8015-8020, 2000；Sharma K. ら, Diabetes, 45, 522-530, 1996；及び Border W.A. ら, Nature, 346, 371-374, 1990）が有効性を示したことより、TGF- β の生理機能を抑制又は阻害することが慢性腎不全の治療に繋がると考えられている。

しかし、満足のいく慢性腎不全治療薬がない現状のもと、期待されているにも

かかわらず、現在までにTGF- β 阻害剤は上市されていない。

【0004】

また、間質の炎症、ひいては繊維化を生じる機序に関しては様々な検討がなされている。糸球体で産生・放出されたIL-1 β などの炎症性サイトカインにより尿細管上皮細胞が活性化され、MCP-1などのケモカイン、インテグリン、オステオポンチンなどの細胞接着分子や細胞外基質を生産して細胞浸潤を促進し、浸潤してきた単球やTリンパ球は更に新たなサイトカインを分泌することで尿管上皮細胞や浸潤細胞に作用して炎症巣が生じ、細胞外マトリクス成分の分解を伴う組織破壊が起こる。破壊された組織の修復の過程での過修復、繊維芽細胞や筋繊維芽細胞(myofibroblast)の関与により、細胞外マトリクス成分の質的变化及び量的増加が起こることも繊維化の機序として考えられている(岡田浩一, 別冊・医学のあゆみ 糸球体腎炎の発症と治療, 120-123, 2001)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

TGF- β は、多種多様の生理機能を示す分化及び成長因子であるため、TGF- β の生理機能全てを阻害することは、長期投与が想定される慢性腎不全の治療においては問題が生じるおそれがある。TGF- β の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的变化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害することが望ましい。

【0006】

本発明の課題は、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングツールとして有用な、TGF- β により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する新規のプロテアーゼのプロモーターを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、配列番号2で表される配列における第1番～第1224番の配列からなる新規プロテアーゼMDTS9をコードするポリヌクレオチドを見出し、続いてヒトゲノムDNAよりMDTS9のプロモーターを見出した。また、前記プロテアーゼは、(1) ADAMTSプロテア

ーゼに分類されることより、細胞外マトリックスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられること、(2) 実際に、ヒトの腎臓での発現が認められること、(3) TGF- β によりプロモーター活性が亢進(すなわちプロテアーゼ発現誘導)されること、及び(4) 腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加していることを見出した。これらにより、本プロテアーゼは、腎不全の原因となるポリペプチドであり、本ポリペプチドのプロモーターを用いて、本プロテアーゼの発現を抑制する物質をスクリーニングすることにより、TGF- β の生理作用のうち、細胞外マトリックス成分の質的変化及び量的増加に関わる部分だけを抑制又は阻害する慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用な物質をスクリーニングすることができることを明らかにした。また、マトリクス・メタロ・プロテアーゼ(MMP)などの細胞外マトリックス分解酵素の発現を誘導する炎症性サイトカインの一つであるIL-1では本発明のプロモーターの活性が減弱する(すなわちプロテアーゼ発現が抑制される)こと、すなわち、本プロテアーゼの発現誘導が炎症時ではなく、組織の修復や細胞外マトリックス成分の質的変化及び量的増加を特徴とする腎繊維化の過程に特異的であることを見出し、本発明のプロモーター阻害剤が慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用であることをさらに明らかにし、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、

[1] 配列番号17で表される塩基配列、あるいは、配列番号17記載の塩基配列の中のいずれかの1～10個の部位において、1～10個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、配列番号2記載のポリペプチドのプロモーター活性を有するポリヌクレオチド。；

[2] 配列番号17で表される塩基配列を含む、[1]記載のポリヌクレオチド；

[3] [1]乃至[2]記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

[4] [3]記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞；

[5] (1) [4]記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び

(2) プロモーター活性を検出する工程

を含む、試験化合物が〔1〕乃至〔2〕記載のポリヌクレオチドのプロモーター活性を阻害するか否かを分析する方法；

〔6〕〔5〕記載の方法による分析工程、及び
プロモーター活性を阻害する物質を選択する工程
を含む、配列番号2記載のポリペプチドの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法；

〔7〕〔6〕記載の方法により、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法；並びに

〔8〕〔5〕記載の方法による分析工程、及び
製剤化工程
を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法
に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳述する。

【0010】

（1）本発明のプロモーターであるポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞

本発明者らは、細胞外マトリックスの代謝に関与するプロテアーゼであり、ヒトの腎臓での発現が認められ、腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加しているMDTS9(Metalloprotease and Disintegrin with Thrombospondin type-1 repeats 9)をコードするポリヌクレオチド及びそのプロモーターを得、塩基配列を決定した(配列番号17)。取得したプロモーターの全長及び部分断片(配列番号17の3253番目から5023番目)を適当なプラスミド、具体的には、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGV-B2内にサブクローニングした。この融合プラスミドのレポーター遺伝子の発現、すなわち、活性によりルシフェラーゼの発現を検出することにより、得られたポリヌクレオチドがプロモーター活性を有していることを確認した。また、本発明者らは、配列番号17記載のポリヌクレオチドが、TGF- β によりプロモーター活性が上昇し、IL-1によりプロモーター活性が減弱することを見出した。

【0011】

本発明のプロモーターは、配列番号17の塩基配列を含み、MDTS9プロモーター活性を有していれば、配列番号17記載のポリヌクレオチドの5'領域のいかなる塩基配列をさらに含んでいても良い。また、配列番号17記載の塩基配列の中のいずれかの1～10個(好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個)の部位において、1乃至複数個(好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個)の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、MDTS9プロモーター活性を有するポリヌクレオチドも、本発明のプロモーターに含まれる。「プロモーター活性」とはDNA鎖の情報をRNA鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味し、「MDTS9プロモーター活性を有する」とは、実施例7記載の方法でプロモーター活性を確認できることであり、好ましくは、実施例8記載の方法でTGF- β によりプロモーター活性が亢進することを意味する。

【0012】

本発明のポリヌクレオチドは、実施例記載の方法で製造する以外に、下記の方法で製造することもできる。

① PCR法を用いた製造

実施例6記載のように、プライマーとヒトゲノムDNAを用いてPCRを行い、配列番号17の塩基配列を含むDNAを製造することができる。一般に、アレル変異体の存在は良く知られている。本方法でDNAを製造した場合に、配列番号17の塩基配列の中のいずれかの部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、MDTS9プロモーター活性を有するDNAが得られる場合もあるが、これも本発明のプロモーターに含まれる。

② DNA合成を用いた製造

配列番号17記載の配列及びその相補鎖を、何本かに分割して化学合成法によって製造し、これらのDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNA断片は、DNA合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社)など)を用いて合成することができる。

【0013】

製造したDNAがMDTS9プロモーター活性を有するか否かは、例えば、実施例7または実施例8記載の方法で確認することができる。

当業者であれば、天然型に存在するプロモーター配列の塩基配列の一部を他の塩基への置換や塩基の欠失、及び／又は付加などの改変により、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAを調製することが可能である。このように天然型の塩基配列において塩基が置換、欠失、及び／又は付加した塩基配列を有し、天然型のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有するDNAもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。塩基の改変は、例えば、制限酵素あるいはDNAエキソヌクレアーゼによる欠失導入、部位特異的変異誘発法による変異導入(Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982))、変異プライマーを用いたPCR法によるプロモーター配列の改変、合成変異DNAの直接導入などの方法により行うことができる(Maniatis, T. et al. (1989): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2nd Edt." Cold Spring Harbor Laboratory, NY)。

【0014】

本発明のMDTS9プロモーターであるポリヌクレオチドは、生体内における変異に由来したMDTS9蛋白質の欠損又は発現異常症の治療や予防に利用することも可能である。例えば、本発明のMDTS9プロモーターとMDTS9コーディング領域を含むMDTS9遺伝子を、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のベクターに挿入し、又はリポソームなどに封入して体細胞に導入することにより、正常な転写制御下にMDTS9蛋白質を発現させることができ、これによりMDTS9蛋白質の欠損又は発現異常症などに対する改善を図ることが可能となる。

【0015】

配列番号17記載のDNAの少なくとも一部分を含むDNAは、プロモーター活性を有するか否かを問わず、本発明のMDTS9プロモーターとこれに結合しうる蛋白質(例えば、転写因子)との結合を拮抗阻害しうる。このため該DNAが、本発明のプロモーターの活性を阻害する蛋白質の結合部位に相当する場合には、このDNAを投与することによりプロモーター活性を促進することができ、逆にプロモーター活性を促進する蛋白質の結合部位に相当する場合には、このDNAを投与することにより

よりプロモーター活性を阻害することができる。拮抗阻害に用いるDNAは、通常少なくとも6塩基以上、好ましくは10塩基以上の鎖長を有する。

【0016】

本発明の組換えベクターは、目的に応じ適宜選択したベクターに、本発明のDNAを組み込むことにより製造できる。例えば、MDTS9プロモーター活性を調節する物質のスクリーニング系構築を目的とする場合は、実施例に記載したように、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を組み込んだベクターに本発明のDNAを組み込んで製造することが好ましい。また、MDTS9蛋白質の欠損又は発現異常症の遺伝子治療を目的とする場合は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のベクターに、本発明のプロモーターとMDTS9コーディング領域のDNAを組み込むことにより製造できる。

【0017】

本発明の形質転換体は、目的に応じ適宜選択した宿主細胞に、本発明のDNAを組み込むことにより製造できる。例えば、MDTS9プロモーター活性を調節する物質のスクリーニング系構築を目的とする場合は、ヒトあるいはマウス、ラットなどの哺乳動物由来で、腎臓組織由来の細胞を用いることが好ましい。

【0018】

(2) 本発明の分析方法及びスクリーニング方法

本発明のプロモーターを用いることにより、試験化合物が、MDTS9のプロモーター活性を阻害するか否かを分析することができる。また、この本発明の分析方法を用いると、MDTS9プロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングすることができる。MDTS9はその配列よりADAMTSプロテアーゼであると考えられることから、細胞外マトリクスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられ、後述の実施例5及び実施例10に示すように、腎臓で発現しているタンパク質であり、しかも、後述の実施例8に示すように、TGF- β により誘導され、IL-1により発現が抑制されるADAMTSプロテアーゼである。従って、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質は、TGF- β の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤の有効成分として有用であり、本発明のプロモータ

一を発現する細胞を、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

【0019】

本発明の分析方法又はスクリーニング方法にかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995)又は通常の合成技術によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法(Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。前記公知化合物には、例えば、プロモーター阻害活性を有することが知られているが、本発明のプロモーターの活性を阻害するか否かが不明な化合物(ペプチドを含む)が含まれる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物(ペプチドを含む)を、化学的又は生物学的に修飾した化合物(ペプチドを含む)を用いることができる。

【0020】

本発明の分析方法は、

- ①本発明のプロモーターを含む発現ベクターでトランスフェクションされた細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び、②プロモーター活性を検出する工程を含む、試験化合物が本発明のプロモーターの活性を阻害するか否かを分析する方法を含む。

【0021】

プロモーター活性を検出する方法としては、実施例7又は実施例8に記載したような配列番号17記載の配列を含むレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常的手段(例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法)によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、

β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2(東洋インキ社製)やpSEAP2-Basic(Clontech社製)などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子の上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に試験化合物を添加することにより、試験化合物の当該プロモーター活性に及ぼす作用を分析することができる。

【0022】

また、本発明には、①上記分析工程、及び、②プロモーター活性を阻害する物質を選択する工程を含む、配列番号2記載のポリペプチド(MDTS9)の発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、又は慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法も含まれる。

上記スクリーニング法で選択するプロモーター活性を阻害する物質としては、後述の実施例8に記載の方法で、TGF- β 処理のみの場合のプロモーター活性の90%以下になる物が好ましく、TGF- β 未処理と同等かそれ以下になる物がさらに好ましい。

【0023】

(3) 本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法

本発明には、(2)記載の本発明の分析方法による分析工程、及び、製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も含まれる。本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法には、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の品質規格の確認試験において、本発明の分析方法により、本発明のプロテアーゼの活性を阻害するか否かを分析する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も含まれる。

また、本発明には、本発明のスクリーニング方法により選択される、本発明の

プロテアーゼの活性を阻害する物質を有効成分とする慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物が包含される。そして、(2) 記載の本発明の分析工程を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法に含まれる。

【0024】

本発明のプロテアーゼの活性を阻害する物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

【0025】

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与又は消化を受けない製剤化手段、例えば、WO95/28963号パンフレットに記載の製剤化手段を適用するのが好ましい。

【0026】

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

【0027】

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤

以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

【0028】

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

【0029】

投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して適宜決定することができる。例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人(体重60kgとして)において、1日につき約0.01~1000mg、好ましくは0.01~100mgである。また、非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01~1000mg、好ましくは0.01~100mgである。

【0030】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法(例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)に従って実施した。

【0031】

実施例1: C末FLAG付加型発現ベクターの作製

プラスミドpCEP4(インビトロジェン社製)を、制限酵素ClaI及びNsiIで切断し、平滑末端化した後、自己連結反応を行なうことにより、エプスタイン・バーウイルス由来のEBNA1発現ユニットを除去した発現ベクターpCEP4dを作製した。得られた発現ベクターpCEP4dを、制限酵素NheI及びBamHIで切断した後、アガロースゲル抽出することにより得られた約7.7kbpのDNA断片に、配列番号3で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号4で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニールさせて得られた二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入することにより、発現ベクターpCEP4d-FLAGを作成した。なお、得られた発現ベクターが目的の配列を有することは、塩基配列により確認した。

【0032】

得られた発現ベクターpCEP4d-FLAGを鋳型とし、配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとして、パイロベスト(PyroBestTM)DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94℃(2分間)で熱変性を行なった後、94℃(30秒間)と55℃(30秒間)と72℃(30秒間)とからなるサイクルを15回繰り返し、最後に72℃(7分間)の伸長反応を行なった。前記PCRにより生じた約0.4kbpのDNA断片を制限酵素SpeIで切断した後、このDNA断片を、制限酵素XbaIで切断したpCEP4d-FLAG(約7.7kbp)に挿入することにより、発現ベクターpCEPdE2-FLAGを作成した。得られた発現ベクターpCEPdE2-FLAGにおいては、プロモーターから下流に向かって、クローニングサイトであるXbaI認識配列、NheI認識配列、NotI認識配列、及びBamHI認識配列、並びにFLAGタグがこの順に配列されている。

【0033】

実施例2：新規プロテアーゼ遺伝子MDTS9の全長ORF遺伝子のクローニング

配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(5'側にSpeI認識配列及びKozak配列が付加してある)と配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(5'側にNotI認識配列が付加してある)との組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA(Marathon-ReadyTM cDNA; クロンテック社製)を鋳型として、DNAポリメラーゼ(TaKaRa LA TaqTM; 宝酒造社製)を用いてPCRを

行なった。前記PCRでは、最初に94℃(2分間)で熱変性を行なった後、98℃(10秒間)と68℃(2分30秒間)とからなるサイクルを40回繰り返し、最後に68℃(7分間)の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約2.2kbpのDNA断片(5'側にSpeI認識配列及びKozak配列が付加され、3'側にNotI認識配列が付加されている)を、プラスミドPCR2.1(インビトロジェン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9Cys1を得た。

【0034】

得られたプラスミドpMDTS9Cys1を制限酵素SpeI及びNotIで切断して生成した約2.2kbpのDNA断片を、前記実施例1で構築したpCEPdE2-FLAGのXbaI部位及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys1-FLAGを構築した。

配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(5'側にSpeI認識配列及びkozak配列が付加してある)と配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓cDNA(Marathon-Ready™ cDNA; クロンテック社製)を鋳型として、DNAポリメラーゼ(TaKaRa LA Tag™; 宝酒造社製)を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94℃(2分間)で熱変性を行なった後、98℃(10秒間)と68℃(30秒間)とからなるサイクルを45回繰り返し、最後に68℃(7分間)の伸長反応を行なった。前記PCRにより生成した約0.2kbpのDNA断片(5'側にSpeI認識配列及びKozak配列が付加されている)を、プラスミドPCR2.1(インビトロジェン社製)にサブクローンすることにより、クローンpMDTS9(5S2-12)を得た。挿入断片は、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAであり、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第1224番のアミノ酸からなる配列をコードする。

【0035】

得られたプラスミドpMDTS9(5S2-12)を制限酵素SpeI及びNcoIで切断して生成した約0.2kbpのSpeI-NcoI DNA断片Aと、先に得られたプラスミドpMDTS9Cys1を制限酵素NcoI及びNotIで切断して生成した約2.0kbpのNcoI-NotI DNA断片Bとを、前記実施例1で構築したpCEPdE2-FLAGのXbaI部位及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを構築した。同様に、前記DNA断片Aと前記DNA断片Bとを、プラスミドpZEr0-2(インビトロジェン社製)のSpeI及びNotI部位

に挿入することにより、プラスミドpZErO-MDTS9Cys2を構築した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGは、新規プロテアーゼ遺伝子MDTS9の配列番号1で表される塩基配列における第1番～第2250番の塩基からなる遺伝子含有し、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番～第750番のアミノ酸からなる配列のC末端に、配列番号11で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。なお、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ADAMTSプロテアーゼであると考えられる。

【0036】

実施例3：MDTS9短長タンパク質(MDTS9Cys2)の発現

実施例2で作製したプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG又は対照として、実施例1で作製したプラスミドpCEPdE2-FLAGを、市販のトランスフェクション試薬(FuGENETM6 Transfection Reagent; ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて、添付指示書に従い、血清培地 [DMEM(GIBCO-BRL社)、10%牛胎児血清、100 μ g/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、及び250 μ g/mL-G418(ナカライテスク社製)] で培養していたHEK293-EBNA(インビトロジェン社製)に導入した。

プラスミド導入後、そのまま48時間培養する(以下、血清培養と称する)か、あるいは、前記プラスミド導入後、そのまま16時間培養し、PBSで2回洗浄した後に、無血清培地 [DMEM (GIBCO-BRL社)、100 μ g/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、250 μ g/mL-G418 (ナカライテスク社製)] にて32時間培養した(以下、無血清培養と称する)。

【0037】

前記血清培養又は無血清培養で得られた各培養液を、遠心分離器(8800型; 久保田製作所社製)により遠心分離(3000rpm, 10分間)することにより、培養上清を得た。また、前記培養液を除去した後に残った各細胞を、抽出液 [20mmol/L-HEPES(pH7.4)、1%トリトンX-100、1%グリセロール、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)] にて15分間処理した後、ピペッティングにより細胞を培養プレートより剥離し、得られた細胞懸濁液を遠心分離器(8800型; 久保田製作所社製)により遠心分離(3000rpm, 10分間)することにより、細胞膜結合画分(上清)と細胞画分(沈澱)と

に分画した。

【0038】

得られた各画分(すなわち、培養上清、細胞膜結合画分、及び細胞画分)における目的タンパク質の発現は、C末端に付加したFLAGタグに対する抗体(マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2;シグマ社製)を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、前記の各画分を、2-MEを用いた還元条件下、SDS/10%~20%アクリルアミドゲル(第一化学薬品社製)を用いて電気泳動した後、ブロッティング装置を用いてポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤(ブロックエース;大日本製薬社製)を添加してブロッキングした後、前記マウス抗FLAGモノクローナル抗体M2と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体(ザイメッド社製又はタゴ社製)とを、順次反応させた。あるいは、前記ブロッキングに続いて、ビオチン化M2抗体(シグマ社製)と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(アマシヤムファルマシアバイオテク社製)とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム(ECLウエスタンブロッティング検出システム;アマシヤムファルマシアバイオテク社製)を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGを導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質(すなわち、MDTS9短長タンパク質)のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)における見かけ上の分子質量は、培養上清において約55~65kDaであり、細胞膜結合画分において約55~65kDaであり、細胞画分において80~95kDaであった。

【0039】

実施例4:MDTS9短長タンパク質のプロテアーゼ活性の確認

(1) プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAGの構築

クイックチェンジ・サイトダイレクテド・ミュータジェネシス・キット(Quick Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit;ストラタジーン社製)を用い、添付の指示書に従って、活性中心と考えられるHis-Glu-Ser-Gly-His(配列番号12)のGlu(グルタミン酸)をGln(グルタミン)に置換した遺伝子MDTS9Cys2E/Qを含有す

るプラスミドpZEr0-MDTS9Cys2E/Qを作製した。なお、鋳型としては、実施例2で作製したプラスミドpZEr0-MDTS9Cys2を用い、プライマーセットとしては、配列番号13で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号14で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。

得られたプラスミドpZEr0-MDTS9Cys2E/Qを制限酵素SpeI及びNotIで切断して生成した約2.3kbpのDNA断片を、前記実施例1で構築したプラスミドpCEPdE2-FLAGのXbaI及びNotI部位に挿入することにより、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAGを得た。

【0040】

(2) α_2 -マクログロブリンとの複合体形成を指標としたプロテアーゼ活性の確認

実施例2で作製したプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG、実施例4(1)で作製したプラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG又は、対照として、実施例1で作製したプラスミドpCEPdE2-FLAGでトランスフェクションした各細胞の血清培養の培養上清を、実施例3で示した手順と同様にして、2-MEを用いた還元条件下、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング剤(ブロックエース;大日本製薬社製)を添加してブロッキングした後、ヤギ抗 α_2 -マクログロブリン抗体[セダーレーン(CEDARLANE)社製]と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgGポリクローナル抗体[ザイメッド(Zymed Laboratories)社製]とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム(ECLウエスタンブロッティング検出システム;アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

【0041】

プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の血清培養の培養上清では、プラスミドpCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG又はプラスミドpCEPdE2-FLAGでトランスフェクションした細胞由来の各血清培養の培養上清で検出されない約250KDaのバンドが検出された。この結果は、MDTS9短長タンパク質(MDTS9Cys2)が α_2 -マクログロブリンと複合体を形成したことを示しており、従って、MDTS9短長タンパク質(MDTS9Cys2)にプロテアーゼ活性があることが確認さ

れた。

【 0 0 4 2 】

実施例 5：MDTS9遺伝子の組織発現分布の確認

市販のcDNAパネル [Clontech社製のMultiple Tissue cDNA (MTCTM) Panelの内、Human MTC Panel I(カタログ番号：K1420-1)、Human MTC Panel II(カタログ番号：K1421-1)、Human Fetal MTC Panel(カタログ番号：K1425-1)、及びHuman Tumor MTC Panel(カタログ番号：K1422-1)] を用いて、MDTS9遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号 1 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 1 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、前記cDNAパネルを鋳型として、DNAポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq^T M; 宝酒造社製) を用いてPCRを行なった。前記PCRでは、最初に94℃ (2分間) で熱変性を行なった後、98℃ (10秒間) と68℃ (1分30秒間) とからなるサイクルを44回繰り返した。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、MDTS9遺伝子のmRNAに由来する約1.1kbpのDNA断片を検出した。その結果、MDTS9遺伝子のmRNAは、腎臓に発現していることが判明した。

【 0 0 4 3 】

実施例 6：MDTS9遺伝子5'上流域遺伝子のクローニング

ヒトゲノムDNA (Genomic DNA; クロンテック社) を鋳型にし、配列番号 1 8 と配列番号 1 9 で示されるオリゴDNAをプライマー、PyroBestTM DNA polymerase (宝酒造社) をDNAポリメラーゼとして、97℃3分の後、96.5℃30秒、72℃2分のサイクルを5回、続いて96.5℃30秒、70℃2分のサイクルを5回、続いて96.5℃30秒、68℃2分のサイクルを5回、続いて96.5℃30秒、63℃25秒、72℃2分のサイクルを25回、続いて72℃7分の条件でPCRを行い、生成した約2kbp断片をpZErOTM-2.1 (インビトロジェン社) のEcoRV認識部位にサブクローニングした。ここで得られたサブクローンの塩基配列を確認した結果、MDTS9遺伝子5'上流域の配列であることが確認でき、配列番号 1 7 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目で示される遺伝子であった。このサブクローンを鋳型、配列番号 2 0 と配列番号 2 1 で示されるオリゴDNAをプライマーとし、PyroBestTM DNA polymerase (宝酒造社) を用いて、95℃3

分の後、97℃20秒、59℃30秒、72℃2分のサイクルを35回、続いて72℃3分の条件でPCRを行い、5'側に制限酵素SacI認識配列、3'側に制限酵素HindIII認識配列を導入した約1.8kbp断片を生成した。このDNA断片を制限酵素SacI、HindIII処理し、ルシフェラーゼアッセイシステム用ベクター(PicaGene Vector 2 ペーシックベクター; 東洋インキ社)のSacI、HindIII部位に挿入し、pGV-B2-MDTS9pro2kを得た。

【0044】

また、5'側にMluI認識配列を付加した配列番号22で示されるオリゴDNAと配列番号23で示されたオリゴDNAのセットと、配列番号24と25で示されるオリゴDNAのセットをプライマー、ヒトゲノムDNA(Genomic DNA; クロンテック社)を鋳型とし、PyroBest™ DNA polymerase(宝酒造社)を用い、96℃2分の後、97℃20秒、60℃30秒、72℃1分のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRを行なった。こうして生成した約600bp、1kbpの断片をpCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)にサブクローニングし、サブクローンpCR4Blunt-TOP05k-1、pCR4Blunt-TOP05k-3を得た。また、配列番号26と27で示されるオリゴDNAのセット、配列番号28と29で示されるオリゴDNAのセットをプライマーとし、ヒトゲノムDNA(Genomic DNA; クロンテック社)を鋳型、PyroBest™ DNA polymerase(宝酒造社)を用い、96℃2分の後、97℃20秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを40回、続いて72℃7分の条件でPCRを行なった。こうして生成した約1.6kb、1.9kbの断片をpCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)にサブクローニングし、サブクローンpCR4Blunt-TOP05k-2、pCR4Blunt-TOP05k-4を得た。pCR4Blunt-TOP05k-3をKpnI、SmaI処理して生成した約0.5kbpの断片とpCR4Blunt-TOP05k-4をSmaI、EcoRI処理して生成した約1.5kbpの断片を連結し、pCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)のKpnI、EcoRI部位に挿入してpCR4Blunt-TOP05k-5を得た。pCR4Blunt-TOP05k-1をMluI、SphI処理して得られる約0.4kbpの断片、pCR4Blunt-TOP05k-2をSphI、KpnI処理して得られる約1.5kbpの断片、pCR4Blunt-TOP05k-5をKpnI、EcoRI処理して得られる約2.1kbpの断片を連結し、pGV-B2-MDTS9pro2kのMluI、EcoRI部位に挿入し、pGV-B2-MDTS9pro5kを得た。ここで得られたサブクローンの塩基配列を確認した結果、配列番号17で示される遺伝子であった。

【0045】

実施例7：MDTS9プロモーター領域DNA配列の解析

実施例6で得られたプラスミドpGV-B2-MDTS9pro2kまたはpGV-B2-MDTS9pro5kを実施例3に示す方法でHEK293-EBNA細胞に導入し、そのまま、DMEM(GIBCO-BRL社)、10%牛胎児血清、100 μ g/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、250 μ g/ml G418(ナカライテスク社製)で、48時間培養を継続した後、PicaGene発色キット(東洋インキ社)を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。この際、測定値は同時導入した β -gal発現プラスミド(pCH110；アマシャムファルマシアバイオテック社)より発現した β -galの活性値で補正した。 β -gal活性の測定はGalacto-Light Plusキット(TROPIX社)を用いた。その結果、pGV-B2-MDTS9pro2kでは約27倍の、及びpGV-B2-MDTS9pro5kでは約27～40倍の、もとのプラスミドであるpGV-B2では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記DNA断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

【0046】

実施例8：MDTS9プロモーター領域DNA配列のTGF- β 、IL-1応答性

実施例6で得られたプラスミドpGV-B2-MDTS9pro5kを実施例3に示す方法でHEK293-EBNA細胞に導入し、そのまま16時間培養した後、PBSで2回洗浄し、DMEM(GIBCO-BRL社)、100 μ g/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、250 μ g/ml G418(ナカライテスク社)に置換し、6時間培養した(以下、無血清培養)。続いて、TGF- β (シグマ社製)又はIL-1(シグマ社製)を添加し、24時間培養後のルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は、実施例7同様、 β -galの活性値で補正した。その結果、TGF- β (1ng/ml)添加により約1.7倍のルシフェラーゼ活性上昇が、IL-1(1ng/ml)添加により約0.7倍以下までルシフェラーゼ活性の減弱が観察された(図1、図2)。このことは上記DNA断片中にTGF- β 応答領域、IL-1応答領域が存在することを示している。一方、pGV-B2-MDTS9pro2kを導入した細胞について、同様に、TGF- β を添加してルシフェラーゼ活性を測定したところ、ルシフェラーゼ活性はコントロールと同等であった。

【0047】

実施例9：ラット腎不全モデルにおけるMDTS9遺伝子の発現変動

(1) 鋳型cDNAの調製

cDNAの調製は、ラット5/6腎摘モデル(木村健二郎, 「腎と透析」1991臨時増刊号, 431-439)の腎臓より調製した。5/6腎摘終了後、1週、2週、3週、4週、6週、8週、及び10週に、5/6腎摘ラット及び偽手術ラットを各々5匹ずつ解剖し、腎臓を摘出し、その後直ちに-80℃にて凍結保存した。これら各群の腎臓を液体窒素凍結下、細胞破碎機(クライオプレスCP-100; マイクロテック・ニチオン社製)を用いて破碎後、総RNA精製試薬(ISOGEN; 日本ジーン社製)を用いて総RNAを調製した。抽出した総RNAをDNアーゼ(ニッポンジーン社製)を用い、37℃で90分間反応させた。DNアーゼ処理した総RNA0.25 μ gをスーパースクリプトIIファーストストランドシステム(RT-PCR用; GIBCO-BRL社製)にてcDNAに変換した。

【0048】

(2) 定量PCRによるラットMDTS9カウンターパートのmRNAの定量

ラット腎不全モデルにおける腎臓での発現変動解析は、実施例7(1)で調製したcDNAを鋳型にして、シークエンスディテクター(Prism7700 Sequence Detector; アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行なった。配列番号30で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号31で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして用いた。PCRは、市販のPCR試薬[サイバーグリーンPCRコアリエージェント(SYBR Green PCR core reagent); アプライドバイオシステムズ社製]を用い、95℃(10分間)の初期変性反応を実施した後、94℃(15秒間)と60℃(30秒間)と72℃(60秒間)とからなるサイクル反応を45回繰り返すことにより実施した。

【0049】

また、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)の遺伝子発現量を算出するため、前記cDNAを鋳型として、配列番号32で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号33で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして同条件のPCRを行なった。更に、mRNA発現量算出に用いる標準曲線を得るために、ラットゲノムDNA(クロンテック社製)を鋳型として、前記プライマーセットを用いて同条件のPCRを行なった。各群における一定量の総RNA当たりのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量を

比較するため、各条件でのラットMDTS9遺伝子のmRNAの発現量は、各条件でのG3PDH遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、ラットMDTS9遺伝子のmRNAは、5/6腎摘モデルにおいて、偽手術ラットに比べ、術後1週で約5倍の遺伝子が発現しており、尿タンパク質量が顕著に増加する術後3週、正常腎重量と比べ著明に腎重量が増加し始める術後6週、更に病態が悪化する術後8週で、それぞれ、約2倍の遺伝子が発現していることが判明した。

本実施例により、腎不全モデルでは、MDTS9の遺伝子が発現誘導されることが明らかとなった。

【0050】

実施例10：ヒト腎臓組織切片の免疫組織染色

(1) 抗ヒトMDTS9抗体の作製

まず、実験解説書(岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」上, 羊土社, p.162-179)に準じて、プラスミドpGEX-6P-1(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を発現ベクターとして用い、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第280番～第410番のアミノ酸からなるペプチドと、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質(GST-MDTS9A)を、大腸菌を用いて封入体画分に生産した。続いて、封入体画分について、調製用SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を実施し、ゲルから拡散法によって目的のGST-MDTS9Aタンパク質を抽出した(岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」下, 羊土社, p.48-51)。

【0051】

得られたGST-MDTS9Aタンパク質を、ウサギ(日本白色種)に10～14日間隔で計5回免疫した後、抗血清を調製した。この抗血清より、まずIgG画分をプロテインGセファロースFFカラム(アマシャムファルマシアバイオテク社製)でアフィニティー精製し、続いて、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第280番～第410番のアミノ酸からなるペプチドと、マンノース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質(MBP-MDTS9A)を固定したカラム(MBP-MDTS9Aカラム)でアフィニティー精製を行ない、抗ヒトMDTS9抗体とした。プロテインGセファロースFFカラムでのアフィニティー精製、並びにCNBr活性化セファロースFFカラム(アマシャム

ファルマシアバイオテック社製)へのMBP-MDTS9Aの固定及びMBP-MDTS9Aカラムでのアフィニティー精製は、添付説明書に従った。また、MBP-MDTS9Aの大腸菌での生産及び精製は、pMAL-c2E(ニュー・イングランド・バイオラボ社製)を発現ベクターとして用い、同社の「pMAL蛋白融合及び精製システム」の指示書に従った。

【0052】

(2) ヒト腎臓でのMDTS9タンパク質の検出

スライドガラス上にホルマリン固定及びパラフィン包埋した組織切片に、実施例8(1)で調製した抗ヒトMDTS9抗体を反応させた後、市販の染色キット(ベクタステインABC-APキット, カタログ番号AK-5000; ベクター社製)を用いて、添付説明書に従い、染色した。その際、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体(カタログ番号BA-1000; ベクター社製)、発色基質としてアルカリフォスファターゼ基質キットI(カタログ番号SK-5100; ベクター社製)を用いた。その結果、健常人及び糖尿病性腎症(初期又は後期)患者の腎臓において、上皮細胞、中でも特に糸球体上皮細胞(podocytes)での染色が認められた。

本実施例から、MDTS9タンパク質がヒト腎臓で発現していることが明らかである。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

【0053】

【発明の効果】

本発明のプロモーターは、TGF- β により誘導され、IL-1により阻害され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、腎臓に発現しているプロテアーゼMDTS9のプロモーターであるので、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質は、TGF- β の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的变化及び量的増加に関わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用である。したがって、本発明のプロモーターであるポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞は、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングツールとして有用である。また、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の品質規格の確認試験における本発明のプロテアーゼの活性を阻害する

か否かを分析する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造も可能とした。

【0054】

【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号3及び4の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したリンカー配列である。また、配列表の配列番号5～9、13及び14、及び20～22の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。更に、配列表の配列番号11の配列で表されるアミノ酸配列は、制限酵素NotI認識ヌクレオチド配列及びFLAGタグアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAの発現により得られるアミノ酸配列である。

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel promoter

<130> 0000003154

<160> 33

<210> 1

<211> 3675

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3675)

<400> 1

atg aag ccc cgc gcg cgc gga tgg cgg ggc ttg gcg gcg ctg tgg atg 48

Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met

1

5

10

15

ctg ttg gcg cag gtg gcc gag cag gca cct gcg tgc gcc atg gga ccc 96

Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro

20

25

30

gca gcg gca gcg cct ggg agc ccg agc gtc ccg cgt cct cct cca ccc 144

Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro

35

40

45

gcg gag cgg ccg ggc tgg atg gaa aag ggc gaa tat gac ctg gtc tct 192

Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser

50

55

60

gcc tac gag gtt gac cac agg ggc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg 240

Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met

65

70

75

80

cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct 288

His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser

85

90

95

ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc tcc agg cac gac ttc cac gtg gat ctg 336

Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu

100

105

110

agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg 384

Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu

115

120

125

gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc 432

Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe.

130

135

140

tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc 480

Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala

145

150

155

160

ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca 528

Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala

165

170

175

gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc 576

Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly

180

185

190

aga gct gcc caa ggc agc tcg cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc 624

Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser

195

200

205

aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg 672

Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg

210 215 220

aca tgg gag ctg gca cat caa ccc ctg cac agc agc gac ctt cgc ctg 720
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu
225 230 235 240

gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg 768
Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met
245 250 255

ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag 816
Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys
260 265 270

tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ctt ctg agg tcc cat aga aat gaa 864
Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu
275 280 285

gaa ctg aac gtg gag acc ttg gtg gtg gtc gac aaa aag atg atg caa 912
Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln
290 295 300

aac cat ggc cat gaa aat atc acc acc tac gtg ctc acg ata ctc aac 960
Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn
305 310 315 320

atg gta tct gct tta ttc aaa gat gga aca ata gga gga aac atc aac 1008
Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn
325 330 335

att gca att gta ggt ctg att ctt cta gaa gat gaa cag cca gga ctg 1056
Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu
340 345 350

gtg ata agt cac cac gca gac cac acc tta agt agc ttc tgc cag tgg 1104
Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp
355 360 365

cag tct gga ttg atg ggg aaa gat ggg act cgt cat gac cac gcc atc 1152
Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile
370 375 380

tta ctg act ggt ctg gat ata tgt tcc tgg aag aat gag ccc tgt gac 1200
Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp
385 390 395 400

act ttg gga ttt gca ccc ata agt gga atg tgt agt aaa tat cgc agc 1248
Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser
405 410 415

tgc acg att aat gaa gat aca ggt ctt gga ctg gcc ttc acc att gcc 1296
Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala
420 425 430

cat gag tct gga cac aac ttt ggc atg att cat gat gga gaa ggg aac 1344
His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn
435 440 445

atg tgt aaa aag tcc gag ggc aac atc atg tcc cct aca ttg gca gga 1392
Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly
450 455 460

cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc agc cgc cag tat cta cac 1440
Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His
465 470 475 480

aaa ttt cta agc acc gct caa gct atc tgc ctt gct gat cag cca aag 1488
Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys
485 490 495

cct gtg aag gaa tac aag tat cct gag aaa ttg cca gga gaa tta tat 1536
Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr
500 505 510

gat gca aac aca cag tgc aag tgg cag ttc gga gag aaa gcc aag ctc 1584
Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu
515 520 525

tgc atg ctg gac ttt aaa aag gac atc tgt aaa gcc ctg tgg tgc cat 1632
Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His
530 535 540

cgt att gga agg aaa tgt gag act aaa ttt atg cca gca gca gaa ggc 1680
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly
545 550 555 560

aca att tgt ggg cat gac atg tgg tgc cgg gga gga cag tgt gtg aaa 1728

Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys
565 570 575

tat ggt gat gaa ggc ccc aag ccc acc cat ggc cac tgg tcg gac tgg 1776
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp
580 585 590

tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc gga ggg gga gta tct cat 1824
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His
595 600 605

agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca tcg cat gga ggg aag ttc 1872
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe
610 615 620

tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc tgc aac agt cag aaa tgt 1920
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys
625 630 635 640

ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct cag tgt gcc gag cac aac 1968
Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn
645 650 655

agc aga cga ttc aga ggg cgg cac tac aag tgg aag cct tac act caa 2016
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln
660 665 670

gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac tgt atc gca gaa gga ttt 2064
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe

675

680

685

gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc aaa gat ggg act cca tgc 2112

Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys

690

695

700

tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat ggg ata tgt gag aga gtt 2160

Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val

705

710

715

720

gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct gtt gaa gac gtc tgt ggg 2208

Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly

725

730

735

gtg tgt aac ggg aat aac tca gcc tgc acg att cac agg ggt ctc tac 2256

Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr

740

745

750

acc aag cac cac cac acc aac cag tat tat cac atg gtc acc att cct 2304

Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro

755

760

765

tct gga gcc cgg agt atc cgc atc tat gaa atg aac gtc tct acc tcc 2352

Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser

770

775

780

tac att tct gtg cgc aat gcc ctc aga agg tac tac ctg aat ggg cac 2400

Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His

785

790

795

800

tgg acc gtg gac tgg ccc ggc cgg tac aaa ttt tcg ggc act act ttc 2448
Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe
805 810 815

gac tac aga cgg tcc tat aat gag ccc gag aac tta atc gct act gga 2496
Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly
820 825 830

cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac 2544
Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn
835 840 845

ccg ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag 2592
Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys
850 855 860

cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag 2640
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu
865 870 875 880

tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc 2688
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys
885 890 895

tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag 2736
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys
900 905 910

aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct 2784

Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro

915

920

925

ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc 2832

Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly

930

935

940

ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat 2880

Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr

945

950

955

960

gac tcg gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc 2928

Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser

965

970

975

agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc 2976

Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala

980

985

990

ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag 3024

Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys

995

1000

1005

cgg gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc tcg gcc aga gcg cag ctg 3072

Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu

1010

1015

1020

ctg ccc gac gct gtc tgc acc tcc gag ccc aag ccc agg atg cat gaa 3120

Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu
1025 1030 1035 1040

gcc tgt ctg ctt cag cgc tgc cac aag ccc aag aag ctg cag tgg ctg 3168
Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu
1045 1050 1055

gtg tcc gcc tgg tcc cag tgc tct gtg aca tgt gaa aga gga aca cag 3216
Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln
1060 1065 1070

aaa aga ttc tta aaa tgt gct gaa aag tat gtt tct gga aag tat cga 3264
Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg
1075 1080 1085

gag ctg gcc tca aag aag tgc tca cat ttg ccg aag ccc agc ctg gag 3312
Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu
1090 1095 1100

ctg gaa cgt gcc tgc gcc ccg ctt cca tgc ccc agg cac ccc cca ttt 3360
Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe
1105 1110 1115 1120

gct gct gcg gga ccc tcg agg ggc agc tgg ttt gcc tca ccc tgg tct 3408
Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser
1125 1130 1135

cag tgc acg gcc agc tgt ggg gga ggc gtt cag acg agg tcc gtg cag 3456
Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln

1140

1145

1150

tgc ctg gct ggg ggc cgg ccg gcc tca ggc tgc ctc ctg cac cag aag 3504

Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys

1155

1160

1165

cct tcg gcc tcc ctg gcc tgc aac act cac ttc tgc ccc att gca gag 3552

Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu

1170

1175

1180

aag aaa gat gcc ttc tgc aaa gac tac ttc cac tgg tgc tac ctg gta 3600

Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val

1185

1190

1195

1200

ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc 3648

Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys

1205

1210

1215

aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3675

Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu

1220

1225

<210> 2

<211> 1224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro
20 25 30
Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro
35 40 45
Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser
50 55 60
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met
65 70 75 80
His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser
85 90 95
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu
100 105 110
Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu
115 120 125
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe
130 135 140
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala
145 150 155 160
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala
165 170 175
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly
180 185 190
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser
195 200 205
Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg
210 215 220
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu

225 230 235 240
Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met
 245 250 255
Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys
 260 265 270
Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu
 275 280 285
Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln
 290 295 300
Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn
305 310 315 320
Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn
 325 330 335
Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu
 340 345 350
Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp
 355 360 365
Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile
 370 375 380
Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp
385 390 395 400
Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser
 405 410 415
Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala
 420 425 430
His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn
 435 440 445
Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly
 450 455 460

Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His
465 470 475 480
Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys
485 490 495
Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr
500 505 510
Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu
515 520 525
Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His
530 535 540
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly
545 550 555 560
Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys
565 570 575
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp
580 585 590
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His
595 600 605
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe
610 615 620
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys
625 630 635 640
Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn
645 650 655
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln
660 665 670
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe
675 680 685
Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys

690 695 700
Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val
705 710 715 720
Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly
725 730 735
Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr
740 745 750
Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro
755 760 765
Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser
770 775 780
Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His
785 790 795 800
Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe
805 810 815
Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly
820 825 830
Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn
835 840 845
Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys
850 855 860
Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu
865 870 875 880
Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys
885 890 895
Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys
900 905 910
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro
915 920 925

Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly
930 935 940
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr
945 950 955 960
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser
965 970 975
Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala
980 985 990
Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys
995 1000 1005
Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu
1010 1015 1020
Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu
1025 1030 1035 1040
Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu
1045 1050 1055
Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln
1060 1065 1070
Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg
1075 1080 1085
Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu
1090 1095 1100
Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe
1105 1110 1115 1120
Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser
1125 1130 1135
Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln
1140 1145 1150
Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys

1155 1160 1165
Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu
1170 1175 1180
Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val
1185 1190 1195 1200
Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys
1205 1210 1215
Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu
1220

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized linker sequence

<400> 3

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa

50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized linker sequence

<400> 4

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg

50

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 5

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc

34

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an

artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ggactagtgt cgaccggtca tggctgcgc

29

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 7

ggactagtgc catgggaccc gcagcggcag cgcctggg

38

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 8

gggcggccgc acccctgtga atcgtgcagg ctgagttatt

40

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 9

ggactagtag catgaagccc cgcgcgcgcg gatggcgggg c

41

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccctgtggtc aacctcgtag gcagagacca

30

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an amino acid sequence obtained by expression of a DNA containing a restriction enzyme NotI recognition nucleotide sequence and a nucleotide sequence encoding a FLAG tag amino acid sequence

<400> 11

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5 10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

His Glu Ser Gly His
1 5

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an

artificially synthesized primer sequence

<400> 13

tggccttcac cattgcccat cagtctggac acaactttgg c

41

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gccaaagttg tgtccagact gatgggcaat ggtgaaggcc a

41

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

caccttaagt agcttctgcc agtggcagtc t

31

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

acaaacatta cggctatcct cgcagcatgg ag

32

<210> 17

<211> 5023

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

atatgaacta caaaaatttt gcacacaatc attgtaattt ttccactaa agacaagtgt 60
tgatgcacaa tacaatgcta cttcttttga aacctgacta gtttcagctg tgtgtgagat 120
gaggaaggaa caaaattaca gactaaacag aatcttttga gggcacaac acatccaatt 180
cttctctgtt tcggttgtat ggatgggtgtt ttacataca aggtaatgtg cccacttgca 240
ctgcttttagt tttaaagtta tgcaatttag aaaagggtta tgacaaagt tggctccttt 300
aatctaaaat gccatttggt tccacatgag aaagggccct ggctcctttc attgtgaaag 360
ggcactgggc atgggagagc atgcagccgt tagaagaaac tctctctcag atcctttgct 420
aagcactttg tttttatttt taatttaatt ttatttctct attgaaacgt ctacttgata 480
ttcaaaatga cctaagtaat cagaacctct gtctgaaagg aaacaagtgc taactgtgaa 540
tggtctaaat aatttacagc aacatttttc tgtgaagggc cagatggtaa atagtttagg 600
ctttgcaggg cacacagtct ctgttgcagt gacttaactc tgccattgtg aaagcattca 660
cagacgatct gcaaacaaat aaaactttat ttacaaaatg agtcagctgg ccagatttga 720
tcttaggcag tagagagttt tctgaccctg gatgtaaaca aatgatgaca aaactgcttt 780
cctaaacttt gacctcaaag ttaagagtgc taagttcttg aagggtgca aagtgaagta 840
gtttgaggct ggcggtttgt tttgactctt ccaatatttg ttctcagggt tactttgctg 900

ggacaccttt aaactgaagg gactccatat acatatntag atttccattt tacctttaaa 960
aattaggcag gtctgggtccc caatactgta tggcaccaac ccatgcgctg gccactcagt 1020
gccaggagtc ccttttaagg cagacacgtg tgctccagtt tgcccctccc tctccatccc 1080
tccttgagac ggacaggcag ctgcgagtta ctgccacat gttagatggc cagtctttaa 1140
ctcgggtccac tcgtgtgttt tgcatctcag ctcccactct ggcctctata gcctggactc 1200
aaccaccctt ctttgttacc tggagacatt catactgcag gatgagcgct gaaatccgtg 1260
caccgctaga ggaactggga aacactagtc attttaaaga atgttgtttc tttcttcaca 1320
atgaaaagag actcatttag cactgctctg gtcttactgt tcttaagcat accgtaagag 1380
tgaatccttt tatatcagcc attcttcttt ttttccatct gtttgaactt acagaagagg 1440
gcccctaggt atctccatgt gatagactgg aaaaaatctc actccctttc atgttacact 1500
ggacacaatt agaagtacgt agagatcccc atttatcaag cgtgcaatgt actcaggaca 1560
agggaaattc tgccggcaga ttctggagac ttccaggcac tgccgaacc ccccttcaag 1620
gtaagtgtaa gctccctgag gtgtgagctg aggcagacgc ttgttaggca ttggcagaga 1680
ggaagggtgg caggtgtttt aaggtccctc ccaatgccag gctttatgta aaaaatattt 1740
gcactttgag gaatggtttc aaataaatga ataagagagg gagtgtgtgt tgctatggaa 1800
tgaggatgcc catacacagc caggcgggtc tactgcccct acctgggggtc tggggcttca 1860
ggacagccct agcagggcgc ctgctgggag ctctccctgg gtaccacag actcgcgaca 1920
ggctgggcaa agaaaagccag agcccaagac accatttccc ccattcatcc cctctccaa 1980
agtgtgcaaa agaggcaacg tcaagctaag ctggctgtga aggacactgg aaccaaacaa 2040
agggcagctg aaggcccagg atccacataa ggtgtgtgat gggaaagcag ccacggatgg 2100
ggagcgccac acacacacac gtgtgcaaac atgcactccc acgcgcgcag tcctactgag 2160
aggtgacagc gtgctggcag tcctcagagc cctcgcttgc tctgggcacc tcccctgcct 2220
gggctccgac tttggcggca tttgaggagc cttcagctc cccactgcac tgtgggagcc 2280
cctttctggg ctggccaagg ctggagccca ctccctcagc ttgcaggag gtgtggaggg 2340
agaggcacga gcgggaaccg gggctgcgtg cagcgcttgc gggccagctg gagttccggg 2400
tgggcgtggg cttggcgggc ccgcactca gagcagccgg ccagccctgc tggccccggg 2460
caatgaggga cttagcacct gggccagtgg ctgcggaggg tgtactgggt cccccagcag 2520
tgccggccca cgggggctgt gctcgatttc ttgccagacc ttagctgcct tcctgcgggg 2580
cagggtctcg gacctgcagc ccgcatgcc tgagcctccc acccactcca tgggctcctg 2640

tgcgccccga gcctcccca ggagcgccac cccctgctcc acagcgccca gtcccatgga 2700
ccaccaagg gctgaggaat gcgagcgcac ggcgaggac tggcaggcag ctccacctgc 2760
gccccggtgc ggggatccac taggtgaagc cagctgggat cctgagtctg gtggggatgt 2820
ggagagtctt tatgtctagc tcagggattg taaatacacc aatcagcacc ctgtgttttag 2880
ctcaaggttt gtgagtgcac caatcgatac tctgtatcta gctgctctgg tggggccttg 2940
gagaacctgt gtgtggaaac tctgtgtatc taactaatct gatggggacg tggagaacct 3000
ttgtatctag ctgagggatg gtaaacgcac caatcagcgc cctgacaaaa caggccactc 3060
ggctctacca atcagcagga tgtcgctagg gccagataag agaataaaag caggctgccc 3120
cagccagccg.tggcaaccgg ctgaggctcc cttccatgct gtggaagctt tgttcttttg 3180
ctttttgcaa taaatcttac tactgtcac tctttttttt tttttttttt tttttttttt 3240
tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tggcgggatc tcggctcact 3300
gcaagctccg cctcccgggt tcacgccatt ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga 3360
ctacaggcgc ccgccactac gccgtctaa ttttttgtat ttttagtaga gacggggttt 3420
caccgtttta gccgggatgg tctcgatctc ctgacctgt gatccgccg cctcggcctc 3480
ccaaagtgt gggattacag gcgtgagcca ccgcgcccg cctactgctc actctttggg 3540
tccactctgc tttcatgagc tgtaacactc accgtgaaga tctgcagctt cactcctgag 3600
cccagcgaga ccacgagccc accgggaaga acgaacaact ccagacgctc tgccttaaga 3660
gtgtgaacac tcaccgcta ggtctgcagc ttcaatcctg agccagcgag accacgaacc 3720
caccagaagg aagaaactcc gaacacatct gaacatcaga agtaacaaac tccagacgca 3780
ccaccttaag agctgtaccc actcaccgag agggatatgc gcttcattct tgaagtcagt 3840
gagaccaaga accaccaat tccagacaca ctatgggctc acagcgtgta ctgcgcaca 3900
cgcagtcagg tgtggatgta caccgcgca caccaggca catgtacacc cgcgcgctca 3960
cacaccccat ccagctacag cagaattctg gcgaggctgt tgaccgcaca cctgctgcct 4020
ccttgccac cctgtccaca cagtagcccg atcgaccccc gtggcggccg agaccaggc 4080
ccatccgcag ccctgagacc tccctaggga ttgcaccag cagccagtca ccggcctccg 4140
cggcctggcc agttgagggt ggccgtgacc gcggggccag gagcgccgcc acatctcggg 4200
gcaaatggcg cgggggaaga gtttctcct cagcctcccc gtctccgatc gctccgcaaa 4260
ctccagagcg aggcacgcgc ctttaaaggc aggtccgcgg ctctcccacg tcctggcgcc 4320
cggttttccg caccagtggt cccacagct gtgcccgggc acagaggcgc ggccagaccg 4380

cactccgcgg gctgcaggtg tcccggcctc tggcggcgcc ggtgcggccc ggaggtggga 4440
gcccgcggag ccactgcagt agctggagtc ccgccgagtc cccagcccca aggcagggca 4500
ggagcgcgca ccggccggag gtccatgctg agcatcgccc gcgccggtgc ccggcagcct 4560
ctccaactgt gtggtccccc cgctggcaga gaggcacgga ctgcaggccg tgggcagctc 4620
catcttcccg cgtctctctc ctctggcgct gcccgctgtc tccgccttc cctctgctcc 4680
cctctgcct ccgcctcagc gccccgctga cctcgcctcc tcccctctgc tctttgtccc 4740
tgactctcc cctcctcggg cctctgacct ccccgccctc acctcctccc ctctctctc 4800
ccctgcccgc cccgcgctct cccaccgctc ccgccgcccc cgccgccgcg gctgccactc 4860
cgccccccgc gccgcacgga gcttcagtaa taaccccgcc gcggcggcgg agtcgctgtg 4920
gggaatctc ccgcgctctg cctgggtcgg gtctccctg cccgctcgca cgctgccggc 4980
cggggaccct ccggtggccc ctagccctc ggagcgctcc tgg 5023

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

tttgagacgg agtctcgctc tgtcgcccag

30

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ccaggagcgc tccgaggggc taggggccca

29.

<210> 20

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 20

aagagctctg ctagctgaga cggagtctcg ctctgtcgcc cag

43

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 21

taaagcttag atctccagga gcgctccgag gggctagggg cca

43

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 22

aaacgcgtat atgaactaca aaaattttgc acacaatcat tg

42

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

catctggccc ttcacagaaa aatgt

25

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

cctaggtatc tccatgtgat agac

24

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

aaggcagcta aggctcggca agaaatcgag

30

<210> 26

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

gtttggtcct tttaatctaa aatgccattt g

31

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggtgtcctt gggctctggc tttct

25

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

aacaaagggc agctgaaggc ccaggatcca c

31

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

tggacagggt ggccaaggag gcagcagg

28

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 30

agcctagctc ccgatccaa

19

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 31

ccaccaccag agtctccaca t

21

<210> 32

<211> 15

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 32

aagcaggcgg ccgag

15

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 33

atcaaaggtg gaagaatggg a

21

【 0 0 5 6 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

pGV-B2-MDTS9pro5kを導入した細胞において、TGF- β 添加によりルシフェラーゼ活性が上昇することを示す図である。

図中、縦軸は、ルシフェラーゼ活性測定値を同時導入した β -gal 発現プラスミドより発現した β -gal の活性値で補正し、TGF- β 非処理の pGV-B2 (空ベクター) 導入細胞の補正値を 1 として示した相対値である。

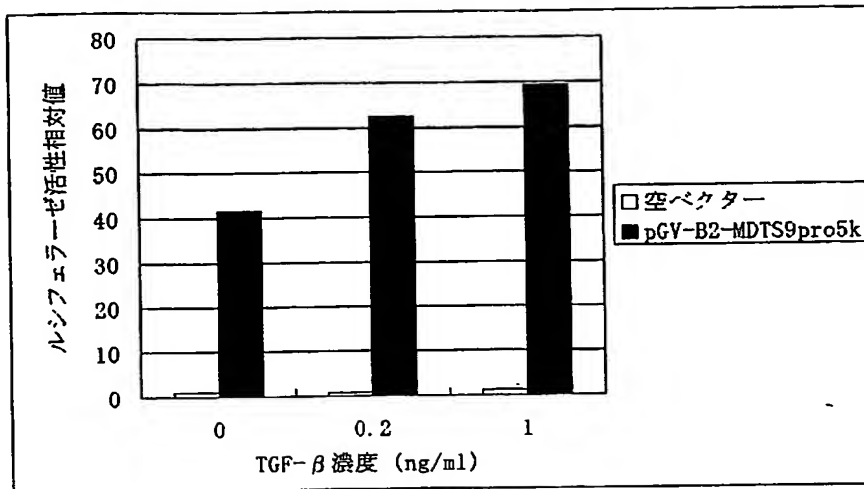
【図 2】

pGV-B2-MDTS9pro5k を導入した細胞において、IL-1 添加によりルシフェラーゼ活性が減弱することを示す図である。

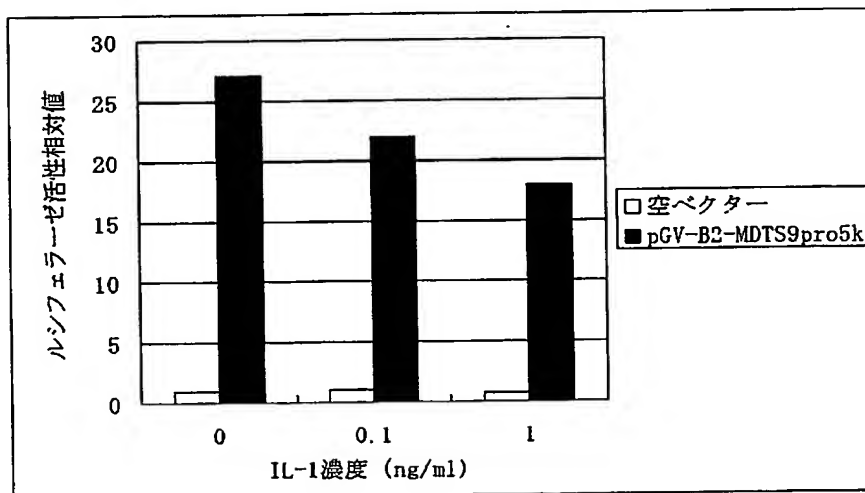
図中、縦軸は、ルシフェラーゼ活性測定値を同時導入した β -gal 発現プラスミドより発現した β -gal の活性値で補正し、IL-1 非処理の pGV-B2 (空ベクター) 導入細胞の補正値を 1 として示した相対値である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングツールとして有用な、TGF- β により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に關与する新規のプロテアーゼのプロモーターを提供する。

【解決手段】 MDTS9プロモーターを取得し、本プロモーターの阻害剤をスクリーニングすることにより、慢性腎不全治療及び／又は予防剤の取得を可能とした。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-180543
受付番号	50200901770
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 6月21日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 6月20日

次頁無

特願2002-180543

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.